

令和元年6月6日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2016～2018  
 課題番号：16K11747  
 研究課題名(和文) iPS細胞を用いた骨再生に関する研究

研究課題名(英文) Study of bone regeneration using iPS cells

## 研究代表者

小山 典昭 (Koyama, Noriaki)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30599931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔領域において骨組織を再生し、機能回復することは極めて重要な課題である。標準的な治療方法は自家骨移植であるが、骨採取部位の侵襲は大きく、採取量にも制限があり、新たな治療法が切に望まれている。今回、われわれはiPS細胞を用いた骨再生に関する研究を行った。iPS細胞から派生した培養上清液を用い骨再生のための細胞源とし、アテロコラーゲンと混合した上で、ラットの骨欠損部に移植した。移植後、屠殺し得られた組織を評価したところ、骨移植部位に骨形成が認められ、骨再生を促す可能性が示唆された。iPS由来骨形成性細胞およびその培養上清液を用いた骨再生は、新たな低侵襲の骨再生治療となり得る可能性が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

骨再生は口腔領域において長年にわたる課題であるが、大きな骨欠損に対して回復する手段の構築に難渋している。体性幹細胞を用いた従来の骨再生療法は、修復量に制限が生じ、そのため適応症例が限られていた。本研究により、iPS細胞を用いて生体の発生生理に準じた培養方法にて得られた細胞を利用して骨形成を行うことは、将来の再生医療の可能性を見据えた上で大変有効であると考えられる。iPS由来骨形成性細胞およびその培養上清液を用いた骨再生が可能になれば、侵襲が限りなく小さく、あらかじめ計画的に作製・保存・準備することが可能であり、大量供給に対応することが可能になる点は非常に有意義であると予想される。

研究成果の概要(英文)：Regeneration and functional recovery of bone tissue in the oral cavity area is a very important task. Although the standard treatment method is autologous bone grafting, the invasiveness of the bone collection site is large, the collection amount is also limited, and a new treatment method is strongly desired. This time, we conducted research on bone regeneration using iPS cells.

The culture supernatant derived from iPS cells was used as a cell source for bone regeneration, mixed with atelocollagen, and transplanted to a rat bone defect site. Evaluation of the tissue obtained after sacrifice after transplantation showed that bone formation was observed at the bone grafting site, suggesting the possibility of promoting bone regeneration. It was suggested that bone regeneration using iPS-derived osteogenic cells and their culture supernatants could be a novel minimally invasive bone regeneration treatment.

研究分野：外科系歯学

キーワード：iPS細胞 培養上清 骨軟骨再生 骨形成

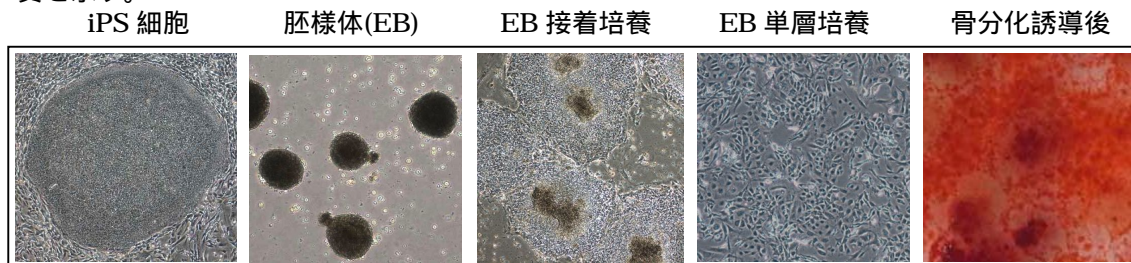
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔領域では、腫瘍・嚢胞・外傷・先天奇形・歯周病などにより、さまざまな組織欠損が生じるが、なかでも骨欠損は生活の質を低下させる大きな問題である。骨組織を再生し、機能回復することは極めて重要な課題である。従来からの骨欠損に対する標準的な治療方法は自家骨移植であるが、骨採取部位の侵襲が大きいことや採取量に限界があるなどの問題があるため、自家骨移植に取って代わる治療方法が切に求められてきた。その一例として、自家骨に代わる人工骨補填材料の開発が盛んに行われ臨床応用されてきた。現在、日本の口腔領域で使用が承認されている主なものには、牛骨由来の天然ハイドロキシアパタイトを用いた異種骨、合成ハイドロキシアパタイトやβ-リン酸三カルシウムからなる人工骨があるが、組織内への遺残により感染源となることや再生組織量に限界があるなどの問題が生じていた。それらの問題点を解決するために口腔領域においても組織工学的概念に基づいた細胞・成長因子・足場の3要素を組み合わせた骨再生が積極的に試みられてきた。

細胞材料としては自己の骨髄間質から誘導した骨形成性細胞が最もよく用いられているが、その他に脂肪細胞、骨膜細胞、歯髄細胞などの体性幹細胞が候補に挙げられている。しかしながら、移植細胞源となる自己体性幹細胞の採取量には限界があり、採取の際の侵襲も無視できないという問題点がある。当大学では、山中らによって再生医療に用いることのできる自己幹細胞材料としてiPS細胞(induced Pluripotent Stem cells)が開発され(Cell, 131(5): 861-872, 2007)、少量のヒト皮膚線維芽細胞の採取によってほぼ無限に増殖可能で多能性を有するヒト未分化幹細胞の取得技術が確立された。

当科では、ヒトiPS細胞から胚様体(Embryo body)を経由し、さらに接着培養することで骨髄間質細胞と類似の性格を有する細胞が得られることを明らかにした。本方法は自然発生に準じたものであり、得られた細胞はさらに単層培養した上で、特定の誘導培地にて骨分化誘導および軟骨誘導が実現できることを確認している。本方法の源となるiPS細胞は一旦作製すれば、ほぼ無限に繰り返し使用できることから、iPS細胞由来骨形成性細胞が骨再生に応用することで、骨欠損部位への適応が拡大すると期待される。以下に培養細胞および骨分化誘導の写真を示す。



### 2. 研究の目的

われわれはこれまでに骨髄間質細胞移植が骨形成作用を示すことを見出してきたが、この骨形成は移植細胞による作用だけでなく、移植細胞が分泌する骨栄養因子の非細胞自律的作用が主要なメカニズムであると考えられる現象を複数認めてきた。このことから、我々は細胞に変わる骨誘導因子として細胞培養上清液(幹細胞由来成長因子)に着目してきた。ヒト骨髄間質細胞培養上清カクテル中には40種類以上のタンパク分子が発現しており、骨形成に關与する血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、表皮増殖因子(EGF)などの成長因子が多く含まれていることが判明した。実際に、ヒト乳歯および骨髄由来の細胞培養上清液をβ-TCPと混合してウサギ頭頂部モデルに移植したところ自家海綿骨移植と同程度の骨造成効果が得られた。細胞培養上清液は含有する個々のタンパク質濃度は低いが、複数のタンパク質およびペプチド成分が含まれることからそれらの相乗作用によって効果を発揮すると考えられ、各成分は低濃度であるために炎症など副作用の出現は少ないことが期待される。そこで、細胞移植治療に取って代わりiPS細胞由来成長因子を含む移植材料による骨再生治療法を新たに開発しようというものである。細胞を含まない移植材料を用いて、生体内にて細胞をとりまく微小環境を再現し、生理的な骨再生を誘導することを目的とした。

### 3. 研究の方法

iPS細胞由来骨形成性細胞のin vitroでの骨マーカー検索、骨分化能、骨形成能評価を行い、骨再生効果を明らかにする。同時に、iPS細胞に由来する他に分化した細胞の混入割合を分析し、分化効率の向上および安全性を明らかにする。続いて、in vivoでの評価として、iPS細胞由来骨形成性細胞を添加した足場材料とともにラットおよびウサギ頭頂骨モデルに移植実験し、骨形成能および組織評価を行う。さらに、iPS細胞由来骨形成性細胞の骨形成能に關与するメカニズムを検討するため、細胞からの分泌成分および細胞破砕物の生理活性分析を行うとともに、iPS細胞由来骨形成性細胞の培養上清液を用いてin vivoでの骨形成能および組織評価を行う。これらの結果をもとに、骨形成能に關与するメカニズムを考察し、iPS細胞を用いた新たな骨再生治療法の開発を目指した。

#### (1) iPS細胞由来骨形成性細胞の骨形成能測定

ヒト iPS 細胞は京都大学 iPS 細胞研究所より供与を受けたものを使用する。ヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の遺伝子導入したもの) から浮遊培養により EB 形成したものをシャーレ上に播種し、接着培養し outgrowth して得られた細胞を実験に用いる (Stem Cells Dev.22, 102-113, 2013)。これは間葉系前駆細胞としての性質を示すことが明らかになっているため、この細胞に間葉系幹細胞マーカーを用いて表面マーカーを解析した上で、また骨分化誘導時における ALP 活性測定、カルシウム産生量測定、RT-PCR 骨系タンパク質 (Collagen Type 1, Osteocalcin, Osteopontin, Runx2) の発現評価を行う。

#### (2) in vivo 骨形成能試験

in vivo 骨形成試験として、ラット頭頂部骨欠損モデルにおける骨形成試験を行う。iPS 細胞から得た間葉系前駆細胞を用いて、骨分化誘導培地にて 14 日間骨分化誘導を行った後、 $\beta$ -TCP 顆粒およびアテロコラーゲンと混合した上で、ラット頭頂部に設けた直径 5mm の骨欠損部に移植する。移植後 4 週、8 週にて屠殺し評価するが、得られた組織はマイクロ CT にて石灰化量を測定した後、パラフィン切片により HE 染色による骨質の評価、凍結切片により骨系マーカーの免疫染色を行う。比較対象群として、ヒト ES 細胞、骨髄細胞および乳歯細胞を用いて同様に移植実験を行い iPS 細胞由来骨芽細胞の優位性や相違性について評価を行う。ヒト ES 細胞は京都大学 iPS 細胞研究所より供与を受けたものを使用し、ヒト骨髄細胞は市販の細胞を使用し、ヒト乳歯細胞は同意の得られた健常な患者より無償供与された細胞を使用する。十分な評価ができなかった場合には、骨欠損サイズの変更を加える、より期間を細かく区切るなどの実験系の再評価を行う予定である。

#### (3) 細胞培養上清液の分析

iPS 細胞由来骨形成性細胞の骨形成能に関与する要因を検討するため、細胞培養上清液の成分分析を行う。シャーレ上に播種した iPS 由来骨形成性細胞が 80%以上コンフルエントになった時点で無血清培地に交換し、48 時間後に上清と細胞を別々に回収し、それぞれの生理活性分析を行う。主要な成長因子含量を Elisa 法およびサイトカインアレイにて測定する。

#### (4) iPS 細胞由来骨芽細胞への成長因子添加による最適条件の検討

前年度の試験結果により得られた iPS 細胞由来骨形成性細胞の最適分化条件にさらに成長因子 (BMP、VEGF、FGF、EGF) を添加することで、骨形成効果の増強を検討する。ヒト iPS 細胞から EB 細胞を経て得られた間葉系前駆細胞にそれぞれ VEGF、FGF、EGF を含んだ培地にて 1 週間培養し、続いて BMP-2 を含んだ培地にて 2 週間培養し、骨分化誘導を行う。ALP 活性測定、カルシウム産生量測定、RT-PCR 骨系タンパク質 (Collagen Type 1, Osteocalcin, Osteopontin, Runx2) の発現評価を行い、従来の骨分化誘導培地で骨分化誘導したものと比較を行う。そこで骨再生増強効果の成長因子の組み合わせ条件にてラット頭頂部骨欠損モデルに移植する。あらかじめ細胞培地に添加した場合と、移植時に混合しものを比較し、成長因子添加のタイミングについても検討を行う。移植後 2 週、4 週、6 週、8 週にて同様に骨形成量、骨質の評価を行い、細胞移植時と同様の検討を行う。

#### (5) 細胞培養上清液移植による骨形成試験

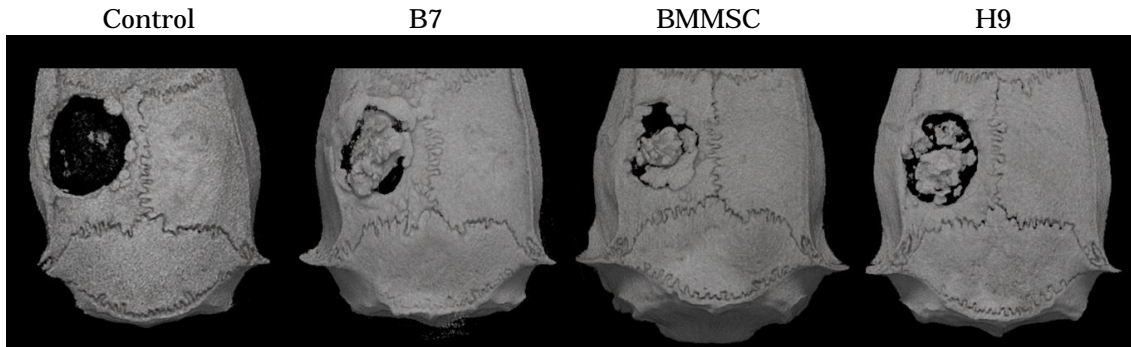
iPS 細胞由来骨形成性細胞の細胞培養上清液による骨形成試験を行う。in vitro にて iPS 由来間葉系前駆細胞ならびにヒト骨髄間質細胞に添加し、増殖活性、幹細胞マーカー発現における効果を検証する。さらに骨分化誘導時におけるアルカリフォスファターゼ活性測定、RT-PCR 骨系タンパク質 (Collagen Type 1, Osteocalcin, Osteopontin, Runx2) の発現評価を行う。さらに、iPS 細胞の培養上清液を含む移植材をラット頭頂部骨欠損モデルに移植し、移植後 2 週、4 週、6 週、8 週にて骨再生量を測定する。マイクロ CT および HE 染色による新生骨評価を行い、骨再生量として比較評価を行う。得られた骨組織は各種免疫染色を行い、新生血管形成についての評価を行う。iPS 細胞由来培養上清の効果の評価するため、対象群としてヒト ES 細胞、骨髄細胞および乳歯細胞の培養上清液を用い比較する。また iPS 細胞から骨分化誘導を行った細胞自体を移植した際の骨形成量と比較評価する。移植後 2 週、4 週、6 週、8 週にて同様に骨形成量、骨質の評価を行い、その結果から、iPS 細胞由来骨形成性細胞による骨形成メカニズムを解析し、幹細胞の生体内での動勢を解明する。さらに培養上清液の濃度を変化させ、局所の骨形成に最適な移植濃度を明らかにするとともに複数の足場材料 ( $\beta$ -TCP、ハイドロキシアパタイト、アテロコラーゲン、ハイドロコロイドゲルなど) との組み合わせることにより徐放効果による骨形成の最適条件を明らかにする。これらを調査することにより臨床応用の可能性を具体化に明らかにする。

#### (6) in vivo ウサギ骨造成モデルでの検討

iPS 細胞培養上清を用いた骨再生を評価するため、ウサギ頭頂部骨造成モデルに移植し、骨造成効果を測定する。本モデルは、血流方向を頭頂骨面の 1 方向からに限定し、規格化したデバイスを用いることで、骨造成量を比較検討することを目的としたものである。ウサギの頭頂骨部骨膜を除去した後、骨表面に直径 6mm の溝を形成し、内部骨面に骨孔を作製した上で、直径 6mm、高さ 6mm の純チタン円筒をウサギ 1 個体につき 4 個設置する。円筒内に最適条件下の iPS 細胞由来骨芽細胞を前年度の試験結果で最も効果の高かった足場材料とともに充填して円筒上面を純チタン製の蓋で被覆する。移植後 8 週において屠殺し、非脱灰標本作製、トルイジンブルー染色して、円筒内部骨量を組織形態学的に評価し、基底面からの新生骨高さおよび円筒内石灰化骨量を基準に石灰化促進効果を比較する。この結果にて、臨床での骨造成に向けた可能性を検証する。

#### 4. 研究成果

iPS 細胞由来骨形成性細胞の *in vitro* での骨マーカー検索、骨分化能、骨形成能評価を行い、骨再生効果を明らかにするために iPS 細胞 (201B7) から単層培養した細胞および骨分化誘導した細胞で培養上清液を回収した。また、比較対象としてヒト BMSC (ヒト骨髄細胞) および ES 細胞 (Line H9) での培養上清液を回収した。続いて、*in vivo* での評価として iPS 細胞由来骨形成性細胞を添加した足場材料とともにラット頭頂骨モデルに移植実験を行った。iPS 細胞から得た間葉系前駆細胞を用いて、骨分化誘導培地にて 14 日間骨分化誘導を行った後、アテロコラーゲンと混合した上で、ラット頭頂部に設けた直径 5mm の骨欠損部に移植した。移植後 4 週、8 週にて屠殺し得られた組織はマイクロ CT にて評価した。以下に得られたマイクロ CT 写真を示す。



iPS 細胞 (201B7) 培養上清液を用いた骨移植部位から骨形成が認められた。しかし、コントロール群においても一部に骨形成が認められ、アテロコラーゲンの条件検討が必要となり、足場材料の条件検討、骨欠損サイズの変更を加えるなどの再評価を行なっていく必要性も考えられた。その後、さらに培養上清液の濃度を変化させ、局所の骨形成に最適な移植濃度を明らかにするとともに複数の足場材料 ( $\beta$ -TCP、ハイドロキシアパタイト、アテロコラーゲン、ハイドロコロイドゲルなど) との組み合わせることにより、徐放効果による骨形成の最適条件の検討を行っているが、明確な最適条件は確認できておらず、引き続き試行回数を増やしながらか検討し続ける必要があると考える。

今回の検討で、iPS 細胞の培養上清液を含む移植材を頭頂部骨欠損モデル動物へ移植した骨形成試験にて、骨移植部位に骨形成が認められ、骨再生を促す可能性が示唆された。この結果より、iPS 由来骨形成性細胞およびその培養上清液を用いた骨再生は、新たな低侵襲の骨再生治療となり得る可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Isobe, Y., Takahashi, K., Kiso, H., Nakao, K., Ikeno, M., Koyama, N., Sugai, M., Shimizu, A., Haga, H., Bessho, K.

Direct evidence for the age-dependent demise of GNAS-mutated cells in oral fibrous dysplasia

査読有(2018) Archives of Oral Biology, 93, pp. 133-140.

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85048400117&doi=10.1016%2fj.archoralbio.2018.05.018&partnerID=40&md5=ba6604c7dfabaf660968c113d8c2cd09>

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.018

Yamanaka, S., Nakao, K., Koyama, N., Isobe, Y., Ueda, Y., Kanai, Y., Kondo, E., Fujii, T., Miura, M., Yasoda, A., Nakao, K., Bessho, K.

Circulatory CNP Rescues Craniofacial Hypoplasia in Achondroplasia

査読有(2017) Journal of Dental Research, 96 (13), pp. 1526-1534.

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85034757016&doi=10.1177%2f0022034517716437&partnerID=40&md5=f5217dd07bf029db898c89fd32a7fb75>

DOI: 10.1177/0022034517716437

Nakao, K., Yasoda, A., Okubo, Y., Yamanaka, S., Koyama, N., Osawa, K., Isobe, Y., Ikeno, M., Fujii, T., Kondo, E., Miura, M., Bessho, K.

A novel therapeutic strategy for midfacial hypoplasia using the CNP/GC-B system

査読有(2017) Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 29 (1), pp. 10-16.

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84998546899&doi=10.1016%2fj.ajoms.2016.07.007&partnerID=40&md5=99bfd8176c2fcd64294b005def66a0c1>

DOI: 10.1016/j.ajoms.2016.07.007

Isobe, Y., Koyama, N., Nakao, K., Osawa, K., Ikeno, M., Yamanaka, S., Okubo, Y., Fujimura, K., Bessho, K.  
Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp  
査読有(2016) International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 45 (1), pp. 124-131.  
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84952872869&doi=10.1016%2fj.ijom.2015.06.022&partnerID=40&md5=7cd1c7cd3e11fef43686fea5f9f8e1bc>  
DOI: 10.1016/j.ijom.2015.06.022

Nakao, K., Osawa, K., Yasoda, A., Yamanaka, S., Fujii, T., Kondo, E., Koyama, N., Kanamoto, N., Miura, M., Kuwahara, K., Akiyama, H., Bessho, K., Nakao, K.  
The local CNP/GC-B system in growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth  
査読有(2016) World Review of Nutrition and Dietetics, 114, pp. 9-10.  
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84959283328&doi=10.1159%2f000441808&partnerID=40&md5=725eca6c329d1a5f5218094c450a4429>  
DOI: 10.1159/000441808

〔学会発表〕(計7件)

軟骨無形成症モデルマウスに生じた顎顔面形態異常に対する、C型ナトリウム利尿ペプチドの有効性について

Author: 山中 茂樹(京都大学 口腔外科), 中尾 一祐, 八十田 明宏, 小山 典昭, 磯部 悠, 藤井 寿人, 近藤 絵里, 三浦 晶子, 別所 和久

Source: 日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集 (1349-0761)33回 Page217(2015.07)

線維性異形成症の病変部におけるGNAS1遺伝子変異の検討

Author: 磯部 悠(京都大学 大学院医学研究科感覚運動系外科学講座口腔外科学分野), 高橋 克, 喜早 ほか, 池野 正幸, 中尾 一祐, 小山 典昭, 別所 和久

Source: 日本口腔科学会雑誌 (0029-0297)64巻2号 Page170-171(2015.07)

降下性壊死性縦隔炎に進展した頭頸部ガス壊疽の1例

Author: 小山 典昭(福井県立病院 歯科口腔外科), 西岡 道規, 渡邊 拓磨, 山中 茂樹, 中尾 一祐, 近藤 定彦

Source: 日本口腔外科学会雑誌 (0021-5163)62巻2号 Page89-94(2016.02)

軟骨無形成症モデルマウスに生じた顎顔面形態異常に対する、C型ナトリウム利尿ペプチドの有効性について 第2報

Author: 山中 茂樹(京都大学 口腔外科), 中尾 一祐, 八十田 明宏, 磯部 悠, 小山 典昭, 三浦 晶子, 稲垣 暢也, 中尾 一和, 別所 和久

Source: 日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集 (1349-0761)34回 Page186(2016.07)

内軟骨性骨化の顎顔面形態に対する影響 軟骨細胞特異的 CNP ノックアウトマウス、CNPトランスジェニックマウスを用いた研究

Author: 佐藤 涼(京都大学 大学院医学研究科感覚運動系外科学講座口腔外科学分野), 山中 茂樹, 中尾 一祐, 磯部 悠, 小山 典昭, 別所 和久

Source: 日本口腔科学会雑誌 (0029-0297)66巻1号 Page48(2017.03)

軟骨無形成症モデルマウスに生じた顎顔面形態異常に対する、C型ナトリウム利尿ペプチドの有効性について(第3報)

Author: 山中 茂樹(京都大学 口腔外科), 中尾 一祐, 八十田 明宏, 磯部 悠, 小山 典昭, 三浦 晶子, 稲垣 暢也, 中尾 一和, 別所 和久

Source: 日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集 (1349-0761)35回 Page164(2017.07)

軟骨無形成症モデルマウスに生じた顎顔面形態異常に対するC型ナトリウム利尿ペプチドの有効性について 第4報

Author: 山中 茂樹(京都大学 口腔外科), 中尾 一祐, 八十田 明宏, 磯部 悠, 小山 典昭, 三浦 晶子, 稲垣 暢也, 中尾 一和, 別所 和久

Source: 日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集 (1349-0761)36回 Page181(2018.07)

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

なし

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：別所 和久

ローマ字氏名：Bessho Kazuhisa

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：90229138

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。